



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/68, 33/577, 33/58		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/22535 (43) Date de publication internationale: 25 juillet 1996 (25.07.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00095		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 19 janvier 1996 (19.01.96)			
(30) Données relatives à la priorité: 95/00597 19 janvier 1995 (19.01.95) FR			
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS [FR/FR]; 3, boulevard Raymond-Poincaré, F-92430 Mantes-la-Coquette (FR).			
(72) Inventeur(s); et		Publiée	
(75) Inventeur/Déposant (US seulement): CALZOLARI, Charles [FR/FR]; 11B, rue du port, F-30220 Aigues-Mortes (FR). FLECHEUX, Odile [FR/FR]; 14, rue des Sables, F-78220 Viroflay (FR). PAU, Bernard [FR/FR]; Le Mas Clos No. 6, Rue Sainte-Geneviève, F-34080 Montpellier (FR).		<i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).			

(54) Titre: **ULTRASENSITIVE PROCESS FOR ASSAYING CARDIAC TROPONINE I**(54) Titre: **PROCEDE DE DOSAGE ULTRASENSIBLE DE LA TROPONINE I CARDIAQUE**

(57) Abstract

The present invention relates to a ultrasensitive process for assaying cardiac troponine I by means of chemiluminescence.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé de dosage ultrasensible de la troponine I cardiaque effectuée par chimiluminescence.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
RJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Subé
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

- 1 -

Procédé de dosage ultrasensible de la troponine I cardiaque

La présente invention concerne un procédé de dosage ultrasensible de la troponine I cardiaque, effectué par chimiluminescence.

L'infarctus du myocarde (IDM) représente toujours une urgence 5 médicale et demeure la principale cause de mortalité et de morbidité cardio-vasculaire dans le monde.

Dans tous les cas, le traitement instauré a pour but de protéger le tissu myocardique de la nécrose irréversible. De nouveaux moyens thérapeutiques, 10 comme les thrombolytiques ou l'angioplastie de première intention, permettent aujourd'hui de restaurer rapidement la circulation coronarienne, de façon à limiter la taille de la zone infarcie et de réduire l'incidence de la mortalité et de la morbidité.

Ces outils thérapeutiques sont d'autant plus efficaces qu'ils sont mis 15 en oeuvre au plus tôt après le début des manifestations cliniques. Les cliniciens confrontés à cette pathologie doivent pouvoir disposer d'outils diagnostiques de plus en plus performants.

Le dosage des protéines sériques et en particulier des enzymes est 20 devenu un élément déterminant pour le diagnostic de l'infarctus du myocarde et pour l'appréciation du succès ou de l'échec d'une réperfusion.

On sait que la troponine est un complexe protéique myofibrillaire, constitué de 3 protéines, les troponines C, I et T.

25 La troponine I cardiaque est une protéine contractile exclusivement présente dans le muscle cardiaque [Wilkinson J.M. et al, Nature (1978), 271, p. 31-35 ; Wade R. et al, Genomics (1990), 7, p. 346-357].

Son rôle physiologique est d'inhiber, en l'absence de calcium, 30 l'activité ATPasique du complexe actine-myosine et donc d'empêcher la contraction musculaire [Perry S.V., Biochem. Soc. Trans (1979), 7, p. 593-617].

Lors de l'infarctus dû à l'obstruction de l'une des artères nourricières du cœur (artère coronaire), il apparaît une ischémie puis une nécrose myocardique 35 qui se traduit par une destruction des cellules cardiaques et la libération de la troponine I cardiaque dans le sang. La troponine I représente donc un marqueur très spécifique de l'infarctus du myocarde.

Ainsi on a récemment préconisé le dosage de la troponine I pour le diagnostic précoce de l'infarctus du myocarde [Am. Heart J. (1981), 110, p. 1334-1344 ; Molecular Immunology (1992), 29 (2), p. 271-278].

5 De plus, il est désormais acquis que chez certains patients l'angor instable – qui représente une étape critique de l'ischémie myocardique –, peut être associé à un haut risque de survenue d'infarctus du myocarde ou de mort subite. Les études *post-mortem* sur cette catégorie de patients ont montré que l'apparition de ces complications était très souvent précédée de micro-infarctus cardiaques
10 [Davies M.J. et al, Circulation (1985), 71, p. 699-708].

Le dosage de la troponine I cardiaque semble donc être particulièrement intéressant dans la détection des sujets à risque, chez les patients atteints d'angor instable, plus spécialement pour le diagnostic des micro-infarctus.

15 Par ailleurs, le dosage de la troponine I peut être envisagé lors de la surveillance d'un traitement thrombolytique pour confirmer le succès ou l'échec de la reperfusion, comme aussi lors du suivi postopératoire des interventions en chirurgie cardiaque (pontages coronariens, angioplasties etc.). Le dosage de la troponine I trouve aussi son application dans le diagnostic des rejets de greffes cardiaques
20 après transplantation et le suivi des thérapeutiques cardiotoxiques utilisant par exemple des anthracyclines.

On connaît déjà des méthodes immunoenzymatiques permettant la détermination de la troponine I. Larue C. et al [Mol. Immunol. (1992), 29(2), p. 271-278 ; Clin. Chem. (1993), 39/6, p. 972-979] décrivent un procédé de dosage immunoenzymatique de type sandwich qui utilise pour la révélation enzymatique le substrat chromogène tетraméthylbenzydine (TMB)- H₂O₂. Après la révélation, la lecture de l'absorbance est faite à 450 nm et la limite de détection, selon les auteurs, est de 0,2 µg/l.
30

Un autre procédé immunoenzymométrique de la troponine I décrit par Bodor et al permet de détecter cette dernière à des concentrations de l'ordre de 1,5 à 3,1 µg/l [Bodor et al, Clin. Chem. (1992), 38/11, p. 2203-2214 ; Adams J. et al, Circulation (1993), 88(1), p. 101-106]. Ce dosage utilise pour la révélation enzymatique un substrat chromogène de la phosphatase alcaline, le p-nitrophénylphosphate, et la mesure est effectuée à 405 nm.
35

Grâce à ces dosages, il a été possible de mettre en évidence la présence de la troponine I dans le plasma des patients, environ 4 heures après le

début des manifestations cliniques de l'infarctus du myocarde [Adams J. et al, Circulation (1993), 88(1), p. 101–106].

Toutefois, la sensibilité de ces dosages immunoenzymométriques est largement inférieure à celle obtenue par des dosages basés sur des méthodes très sophistiquées et difficiles à mettre en oeuvre, par exemple des dosages basés sur la mesure de la radioactivité [Am. Heart Journal, (June 1987), 113(6), p. 1333–1334].

On sait aussi que des dérivés cycliques d'hydrazines, notamment les diacylhydrazines, peuvent être utilisés comme réactifs de chimiluminescence [Roswell et al, Methods Enzymol. (1978), 57, p. 409–423]. L'utilisation de ces réactifs a été envisagée ou effectuée lors de certains dosages immunoenzymatiques [Thrope G.H.G. et al, Clin. Chem. (1985), 31, p. 1335–1341 ; Thrope G.H.G. et al, Medors. Enzymol. (1988), 133, p. 331–353] (Demande WO 88/00695). Par ailleurs, on connaît des méthodes de détection par chimiluminescence mettant en oeuvre la décomposition enzymatique de dérivés du 1,2-dioxetane.

Toutefois, il est connu que la mise en oeuvre de ces réactifs nécessite des recherches intensives puisque l'homme de l'art est confronté à de multiples facteurs limitant pour la mise au point des dosages sensibles (affinité des différents composants de dosage et notamment du système antigène/anticorps, marqueur enzymatique, substrat, principe de détection etc.). En effet, un choix adéquat des différents réactifs et conditions de dosage s'impose. Il est évident que l'on ne peut pas imaginer un dosage sensible et spécifique lorsque le bruit de la mesure (bruit de fond ou bruit de blanc) est important ou lorsque le rapport signal/bruit de la mesure est trop petit. Or justement ce bruit de la mesure dépend des différents réactifs et conditions de dosage choisis.

Il a été maintenant trouvé qu'il était possible, en utilisant un certain type d'anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque et de substrats adéquats pour la révélation enzymatique, de procéder au dosage par chimiluminescence de la troponine I avec une très grande sensibilité. En effet, en appliquant le procédé de l'invention il est possible d'obtenir une sensibilité de l'ordre de 2 à 5 ng/l, ce qui représente une sensibilité 40 à environ 1500 fois supérieure à celles des procédés immunoenzymométriques de la troponine I les plus sensibles connus jusqu'à présent.

La présente invention concerne un procédé de dosage immunoenzymatique de type sandwich permettant le dosage quantitatif de la troponine I cardiaque caractérisé en ce que les substrats utilisés pour la révélation enzymatique sont des substrats chimiluminescents, choisis parmi un grand nombre

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

de substrats chimiluminescents, en particulier des dérivés d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane.

La présente invention a plus précisément comme objet, un procédé de dosage immunoenzymatique de type sandwich, de la troponine I cardiaque :

- 5 – qui met en oeuvre deux anticorps monoclonaux anti-troponine cardiaque dont un est couplé avec un marqueur enzymatique, lesquels anticorps ont, soit naturellement, soit par coopérativité une grande affinité pour la troponine I cardiaque, donc une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M, de préférence égale ou inférieure à 10^{-9} M.
- 10 et
- qui utilise pour la révélation enzymatique un substrat chimiluminescent qui est soit un dérivé d'une diacylhydrazine, soit un dérivé de 1,2-dioxetane.

En effet, la présente invention concerne un procédé de dosage immunoenzymatique quantitatif de type sandwich de la troponine I cardiaque, caractérisé en ce que l'on met en contact les échantillons à doser ou les standards avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et avec un autre anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque, ces anticorps monoclonaux, soit naturellement, soit par effet de coopérativité, ayant pour 20 la troponine I cardiaque une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M, de préférence égale ou inférieure à 10^{-9} M, puis que l'on effectue la révélation enzymatique par addition d'un substrat chimiluminescent choisi et ensuite que l'on procède à la lecture directe du signal lumineux obtenu.

25 Le procédé de l'invention peut être réalisé soit par un système manuel (kit de dosage de diagnostic) soit par un système automatisé. Selon le mode de réalisation, il est possible d'effectuer soit un dosage en un temps, soit un dosage en deux temps.

30 Pour le dosage en un temps, les échantillons à doser ou les standards sont mis en contact simultanément avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque éventuellement fixé sur un support solide. Après incubation et lavage, on procède à la révélation enzymatique. Cette dernière est effectuée selon l'invention par addition d'un substrat chimiluminescent 35 dérivé d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane. La quantité de la troponine I cardiaque présente dans les échantillons à doser ou les standards, est évaluée par la lecture directe du signal lumineux obtenu.

Pour le dosage en deux temps, on met en contact les échantillons à doser ou les standards,

- soit, d'abord avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique, puis après incubation, avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque éventuellement fixé sur un support solide et ensuite on incube de nouveau,

5 - soit, d'abord avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque éventuellement fixé sur un support solide, puis après incubation et un éventuel lavage, avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et ensuite on incube à nouveau.

Dans les deux cas, on procède ensuite éventuellement à un lavage,
10 puis à la révélation enzymatique qui est effectuée selon l'invention, par addition d'un substrat chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane. La quantité de la troponine I cardiaque présente dans les échantillons à doser ou les standards, est évaluée par la lecture directe du signal lumineux obtenu.

Pour le dosage en deux temps, de manière préférentielle, les échantillons à doser et les standards sont mis en contact d'abord avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique puis après incubation, avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque fixé sur un support solide et ensuite incubés de nouveau.

Comme anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque, on peut
20 utiliser tout anticorps monoclonal ayant une grande affinité pour la troponine I cardiaque et dont la constante de dissociation à l'équilibre est égale ou inférieure à 10^{-8} M, de préférence égale ou inférieure à 10^{-9} M. On peut aussi utiliser tout couple d'anticorps monoclonaux ayant une liaison coopérative vis à vis de la troponine I cardiaque, cette coopérativité produisant comme résultat une
25 augmentation de l'affinité de l'un des deux anticorps monoclonaux pour la troponine I cardiaque (constante de dissociation à l'équilibre $\leq 10^{-8}$ M) lorsque la troponine I cardiaque est déjà liée avec le deuxième anticorps.

De manière préférentielle, comme anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque, on peut utiliser les anticorps monoclonaux 11E12 et 8E1 de souris décrits dans Clin. Chem. (1993), 39, p. 972-979. En effet, de manière surprenante il a été constaté que l'anticorps monoclonal 11E12 bloque la libération de la troponine I cardiaque liée à l'anticorps 8E1. Ce phénomène a été mis en évidence en utilisant le système BIACORE™ de PHARMACIA, et en mesurant les constantes cinétiques d'association et de dissociation de la troponine I cardiaque (cTnI) sur l'anticorps monoclonal 8E1, en présence ou en l'absence de l'anticorps 11E12.

Les différents résultats sont donnés dans le Tableau I.

TABLEAU I

	AcM 8E1 : cTrI seule	AcM 8E1 : cTrI+11E12
CONSTANTE CINETIQUE DE DISSOCIATION $k_{off}(s^{-1})$	$3,2 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$
CONSTANTE CINETIQUE D'ASSOCIATION $k_{on} (M^{-1} \cdot s^{-1})$	$5,8 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^5$
CONSTANTE DE DISSOCIATION A L'EQUILIBRE $k_{off} / k_{on} (M)$	$5,7 \cdot 10^{-9}$	$0,6 \cdot 10^{-9}$

5 Les résultats du Tableau I démontrent que pour l'anticorps 8E1, l'affinité est 10 fois plus élevée si la troponine I cardiaque est en présence de l'anticorps monoclonal 11E12. Plus précisément, la constante de dissociation à l'équilibre est 10 fois plus faible (la constante cinétique d'association ne varie pas). Il existe donc une coopérativité de la liaison des deux anticorps monoclonaux anti-10 troponine I vis à vis de la troponine I cardiaque. Grâce à cette effet de "blockage" de la dissociation du complexe il est possible de réaliser le procédé de dosage immunoenzymatique, objet de la présente invention, avec ce couple d'anticorps monoclonaux.

15 Pour la formation du conjugué anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque-marqueur enzymatique on utilise comme marqueur enzymatique soit la phosphatase alcaline soit la peroxydase.

On utilise la phosphatase alcaline lorsque le substrat chimiluminescent est un dérivé de 1,2-dioxetane et la peroxydase lorsque le substrat chimiluminescent est un dérivé d'une diacylhydrazine.

On peut utiliser notamment les anticorps monoclonaux 8E1 ou 11E12 pour préparer les conjugués avec un marqueur enzymatique. De préférence on prépare des conjugués de l'anticorps monoclonal 11E12 avec la peroxydase et des conjugués de l'anticorps monoclonal 8E1 avec la phosphatase alcaline.

25 Selon le mode de réalisation, on peut envisager somme support solide soit des tubes en polystyrène sur lesquels est fixé l'anticorps anti-troponine I cardiaque (cas du kit de diagnostic), soit des particules magnétiques (notamment ferriques) ou non sur lesquelles est fixé l'anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque (dosage automatisé).

Les conjugués anticorps monoclonal anti-troponine I - marqueur enzymatique sont préparés selon les méthodes connues [J. Histochem Cytochem (1974), 22, p. 1084-1091].

La préparation des anticorps monoclonaux anti-troponine I fixés par exemple par des liaisons covalentes sur une phase solide, est aussi réalisée selon des méthodes décrites dans la littérature [J. Immunological Methods, (1979), 31, p. 231-236].

Lors de la mise en contact des échantillons à doser ou des standards avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque et/ou un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique, le pH du milieu réactionnel doit être de préférence légèrement acide. Le pH doit notamment être compris entre 5 et 6, plus précisément entre 5,4 et 5,7. Pour ajuster le pH on peut utiliser différents tampons adéquats ou des solutions d'acides organiques faibles, par exemple des solutions ou des tampons d'acide succinique ayant un pH de 5,2 à 5,4.

L'incubation entre le plasma ou le serum et les anticorps anti-troponine I ou les standards, est effectuée entre 20°C et 37°C et le temps d'incubation peut varier entre 5 et 20 minutes.

Après incubation, on procède à un ou plusieurs lavages qui sont effectués à une température de 2° à 37°C, de préférence à une température inférieure à 10°C. Pour les lavages, on utilise de manière préférentielle une solution de tampon phosphate pH 6,8 ou une solution tampon tris pH 8.

Comme il a été indiqué précédemment, comme substrat luminescent on utilise soit un dérivé de diacylhydrazine, plus spécialement le luminol [5-amino-2,3-dihydroptalazine-1,4-dione], soit un dérivé de 1,2-dioxetane, plus spécialement le lumigen PPD [sel disodique de 4-methoxy 4-(3-phosphatophenyl) spiro (1,2-dioxetane 3-adamantane-2')]. Des substrats luminescents contenant du luminol sont disponibles dans le commerce comme par exemple le luminol ECL-immunoessai signal reagent RPN 190 commercialisé par Amersham ou le luminol BM Chamiluminescence ELISA reagent 1582950 commercialisé par Boehringer Mannheim. On préfère des substrats qui contiennent un mélange de luminol et de 4-iodophénol. Des substrats luminescents contenant du lumigen PPD sont aussi disponibles dans le commerce comme, par exemple, le Lumi-Phos 530 commercialisé par Analytical Luminescence Laboratory. Ce réactif contient du lumigen PPD et un promoteur de la chamiluminescence qui est un tensioactif dérivé de la fluorescéine.

La révélation enzymatique est aussi effectuée à une température comprise entre 20°C et 37°C. La lecture de la chimiluminescence est effectuée de préférence après environ 2-10 minutes.

- 5 Pour réaliser la gamme d'étalonnage d'un dosage quantitatif on utilise des solutions standards (standards) de la troponine I cardiaque humaine purifiée [Larue C. et al, Clin. Chem. (1993), 39, p. 972-979].

10 L'invention concerne aussi l'utilisation du luminol et du lumigen PPD comme substrats chimiluminescents pour le dosage immunoenzymatique de type sandwich de la troponine I cardiaque mettant en œuvre deux anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un couplé avec un marqueur enzymatique, en particulier la peroxydase, si le substrat est le luminol, et la phosphatase alcaline, si le substrat est le lumigen PPD, lesquels anticorps (soit naturellement, soit par coopérativité) ont pour la troponine I cardiaque une constante 15 de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M.

20 L'invention a également pour objet une trousse de dosage de la troponine I cardiaque comprenant deux anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un est couplé avec un marqueur enzymatique lesquels anticorps, soit naturellement, soit par coopérativité ont pour la troponine I cardiaque une constante 25 de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-9} M, et un substrat chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine, de préférence le luminol ou un dérivé, de 1,2-dioxetane, de préférence le lumigen PPD.

Les exemples suivants, donnés à titre non limitatif, illustrent 25 l'invention.

EXAMPLE I

Dosage de la troponine I cardiaque avec un système automatisé

30 Le système automatisé utilisé pour le dosage immunoenzymatique est le système Access® immuoessai, système commercialisé par Sanofi Diagnostics Pasteur.

35 Le dosage est effectué de la manière suivante : Dans la cupule du dosage sont introduits 50 µl de l'échantillon à doser, 25 µl d'une solution d'immunoglobulines de souris à 4 mg/ml, 10 µl d'une solution d'acide succinique 0,1 M, 50 µl du conjugué anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque de souris 8E1-phosphatase alcaline (C = 5 µg/ml).

Après incubation pendant 5 minutes à 37°C sont introduits 50 µl de billes de latex ferriques (Rhône Poulenc réf. MI-070/60) sur lesquelles sont fixés par des liaisons covalentes des anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque de souris 11E12.

5

Le mélange est incubé pendant 36 secondes à 37°C, puis les billes de latex ferriques sont séparées à l'aide d'un champ magnétique. On procède au lavage à l'aide d'une solution tampon Tris pH 8 on ajoute ensuite 200 µl de substrat Lumi-Phos™ 530.

10

La révélation est effectuée à 37°C et on mesure la luminescence générée par la réaction avec un luminomètre.

Le temps total d'analyse est de 15 minutes.

Pour la gamme d'étalonnage on utilise des solutions de la troponine I cardiaque humaine purifiée.

On effectue une gamme d'étalonnage correspondant à des concentrations comprises entre 0 et 50 µg/l.

La sensibilité du procédé, évaluée par la courbe d'étalonnage, est de 3,5 ng/l.

EXEMPLE II

Dosage de la troponine I cardiaque avec un kit immunoenzymatique

Dans des tubes en polystyrène revêtus d'anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque de la souris 8E1, on introduit 150 µl d'une solution tampon succinate contenant du Tween 20 à 0,2 %, des immunoglobulines de souris non spécifiques et 0,1 % de Kathon, 50 µl du conjugué anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque de souris 11E12-peroxydase, et 200 µl d'échantillon à doser ou d'une solution étalon utilisée pour la gamme d'étalonnage.

Pour la gamme étalonnage on utilise du sérum humain contenant de 0 à 2 µg/l de troponine I cardiaque humaine purifiée.

35

On incube 15 minutes précisément sous agitation horizontale à température ambiante, puis on procède au lavage des tubes de la façon suivante :

- on renverse le contenu des tubes dans un récipient et on éponge les tubes sur un papier absorbant,
- 5 - on procède au lavage en ajoutant 1 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8 contenant du Tween 20 à 0,1 % et 0,3 % de Kathon, en maintenant la température au plus à 8°C. On répète cette étape 3 fois.

Après avoir procédé au lavage et éliminé toute trace de la solution utilisée pour ce dernier, la révélation enzymatique est effectuée en utilisant 300 µl d'un mélange constitué de 100 parties de luminol (BM chimiluminescent ELISA reagent Boehringer Mannheim) et 1 partie d'eau oxygénée.

10 On laisse à température ambiante et on mesure la luminescence avec un luminomètre après 3 minutes. Chaque tube est lu pendant exactement 30 secondes ou exactement 10 secondes.

15 La sensibilité de ce dosage est de 3 ng/l.

Les valeurs des rapports signal net/bruit de la mesure (S-B)/B obtenues selon le procédé décrit ci-dessus et selon le procédé décrit par Larue C. et al [Mol. Immunol. (1992), 29(2), p. 271-278 ; Clin Chem. (1993), 39/6 p. 972-979] sont données dans le Tableau II ci-après.

TABLEAU II

Concentration en Troponine I cardiaque	Procédé de l'exemple	Procédé décrit par Larue et al
100 ng/l	$\frac{S-B}{B} = \frac{1200 - 95;95}{95} = 11,6$	$\frac{S-B}{B} = \frac{150 - 50}{50} = 2,0$
10 ng/l	$\frac{S-B}{B} = \frac{250 - 95}{95} = 1,6$	$\frac{S-B}{B} = 0 \quad (S = B)$

25

Les valeurs des rapports signal/bruit de la mesure obtenue en appliquant le procédé de l'invention prouvent sa grande sensibilité et sa spécificité

REVENDICATIONS

- 1- Procédé de dosage immunoenzymatique de type sandwich de la troponine I cardiaque caractérisé en ce que l'on met en oeuvre deux anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un est couplé avec un marqueur enzymatique lesquels anticorps, soit naturellement, soit par coopérativité ont pour la troponine I cardiaque une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M, de préférence égale ou inférieure à 10^{-9} M et que l'on utilise pour la révélation enzymatique un substrat chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane.
- 5
- 2- Procédé selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :
- 15 a-les échantillons sont mis en contact avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque,
- b-la révélation enzymatique est effectuée par addition d'un substrat chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane,
- c-la quantité de la troponine I cardiaque est évaluée par la lecture directe du signal lumineux obtenu.
- 20
- 3- Procédé selon les revendications 1 ou 2 comprenant les étapes suivantes :
- 25 a-les échantillons à doser ou les standards sont mis en contact simultanément avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque fixé éventuellement à un support solide,
- b-le mélange réactionnel est incubé,
- c-puis lavé,
- d-la révélation enzymatique est effectuée par addition d'un substrat chimiluminescent, dérivé d'une diacylhydrazine ou dérivé du 1,2-dioxetane,
- 30 e-la quantité de la troponine I cardiaque présente dans des échantillons à doser ou les standards, est évaluée par la lecture directe du signal lumineux obtenu.

FÉUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

- 4- Procédé selon les revendications 1 ou 2 comprenant les étapes suivantes :
- a- les échantillons à doser ou les standards sont mis en contact,
- 5 - soit, d'abord avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique, puis après incubation, avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque éventuellement fixé sur un support solide, et incubés de nouveau,
- 10 - soit, d'abord avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque éventuellement fixé sur un support solide puis après incubation et lavage éventuel, avec un deuxième anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et incubés à nouveau,
- b- le mélange réactionnel est ensuite éventuellement lavé,
- c- la révélation enzymatique est effectuée par addition d'un substrat chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine ou dérivé de 1,2-dioxetane,
- d- la quantité de la troponine I cardiaque présente dans les échantillons à doser ou dans les standards est évaluée par la lecture directe du signal lumineux obtenu.
- 20 5- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le substrat chimiluminescent est le luminol.
- 6- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le substrat chimiluminescent est le lumigen PPD.
- 25 7- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les anticorps monoclonaux anti-troponine I, sont les anticorps monoclonaux de souris 11E12 et 8E1.
- 8- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le marqueur enzymatique couplé à l'anticorps monoclonal anti-troponine I, est la phosphatase alcaline ou la peroxydase.
- 30 9- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique est le conjugué anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque de souris 11E12-peroxydase et le substrat chimiluminescent est un dérivé d'une diacylhydrazine.

- 10- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 4 caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique est le conjugué anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque de souris 8E1-phosphatase alcaline et le substrat chimiluminescent est un dérivé du 1,2-dioxetane.
- 5
- 11- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que le substrat chimiluminescent est un mélange de luminol et de 4-iodophénol.
- 10 12- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la mise en contact des échantillons à doser ou des standards, avec un anticorps monoclonal anti-troponine I cardiaque couplé à un marqueur enzymatique et éventuellement à un deuxième anticorps anti-troponine I, est effectuée à un pH légèrement acide compris entre 5 et 6, de préférence entre 15 5,4 et 5,7.
- 20 13- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que les solutions de lavage utilisées avant révélation ont un pH égal à 6,8-8 et une température de 2° à 37°C, de préférence à une température inférieure à 10°C.
- 25 14- Utilisation du luminol comme substrat chimiluminescent pour le dosage immunoenzymatique de type sandwich de la troponine I cardiaque mettant en oeuvre deux anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un couplé avec la peroxydase, lesquels anticorps soit naturellement soit par coopérativité, ont pour la troponine I cardiaque une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M.
- 30 15- Utilisation du lumigen PPD comme substrat chimiluminescent pour le dosage immunoenzymatique de type sandwich de la troponine I cardiaque mettant en oeuvre deux anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un couplé avec la phosphatase alcaline, lesquels anticorps soit naturellement soit par coopérativité, ont pour la troponine I cardiaque une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-8} M.

- 16- Trousse de dosage de la troponine I cardiaque comprenant deux anticorps monoclonaux anti-troponine I cardiaque dont un est couplé avec un marqueur enzymatique lesquels anticorps, soit naturellement, soit par coopérativité ont pour la troponine I cardiaque une constante de dissociation à l'équilibre égale ou inférieure à 10^{-9} M, et un substrat chimiluminescent dérivé d'une diacylhydrazine ou du 1,2-dioxetane

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PL./FR 96/00095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CLINICAL CHEMISTRY, vol. 39, no. 6, June 1993, WINSTON US, pages 972-979, XP002003381</p> <p>C. LARUE ET AL.: "Cardiac-specific immunoenzymometric assay of Troponin I in the early phase of acute myocardial infarction." cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	1-16
Y	<p>BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 15, no. 6, December 1987, LONDON, GB., pages 1060-1061, XP002003382</p> <p>B. CUMMINS ET AL.: "Immunoassay of the cardiac-specific isoform of troponin-I in the diagnosis of heart muscle damage." see the whole document</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-16

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 1996

Date of mailing of the international search report

30.05.96 ,

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (- 31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PLI/FR 96/00095

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 116 454 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 22 August 1984 see claims ---	1-16
Y	CLINICAL CHEMISTRY, vol. 38, no. 11, November 1992, WINSTON US, pages 2203-2214, XP002003383 G. S. BODOR ET AL.: "Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction." cited in the application see page 2206 ---	1-16
A	WO,A,94 27156 (FORTRON BIOSCIENCE, INC.) 24 November 1994 see abstract; claims ---	1-16
Y	WO,A,93 13405 (TROPIX, INC.) 8 July 1993 see claims 7-10 ---	1-4,6, 10,15,16
Y	WO,A,90 00168 (TROPIX, INC.) 11 January 1990 see the whole document -----	1-4,6, 10,15,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/FR 96/00095	
---	--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-116454	22-08-84	AU-B-	575552	04-08-88
		AU-B-	2427184	16-08-84
		CA-A-	1217121	27-01-87
		JP-C-	1649482	30-03-92
		JP-B-	3005539	25-01-91
		JP-A-	59171839	28-09-84
		US-A-	4598044	01-07-86
<hr/>				
WO-A-9427156	24-11-94	AU-B-	6834894	12-12-94
		CA-A-	2162121	24-11-94
		EP-A-	0699306	06-03-96
<hr/>				
WO-A-9313405	08-07-93	US-A-	5336596	09-08-94
		AU-B-	3279293	28-07-93
		CA-A-	2126447	08-07-93
		EP-A-	0619018	12-10-94
		FI-A-	943027	22-06-94
		JP-T-	7502559	16-03-95
		NO-A-	942386	22-06-94
<hr/>				
WO-A-9000168	11-01-90	US-A-	4931223	05-06-90
		DE-D-	68908685	30-09-93
		DE-T-	68908685	05-01-94
		EP-A,B	0377729	18-07-90
		JP-T-	3505667	12-12-91
<hr/>				

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N° PL./FR 96/00095
--

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/58

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>CLINICAL CHEMISTRY, vol. 39, no. 6, Juin 1993, WINSTON US, pages 972-979, XP002003381</p> <p>C. LARUE ET AL.: "Cardiac-specific immunoenzymometric assay of Troponin I in the early phase of acute myocardial infarction." cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p> <p>BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 15, no. 6, Décembre 1987, LONDON, GB., pages 1060-1061, XP002003382</p> <p>B. CUMMINS ET AL.: "Immunoassay of the cardiac-specific isoform of troponin-I in the diagnosis of heart muscle damage." voir le document en entier</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-16
Y		1-16

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international; mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "a" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 Mai 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30 -05- 1996

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patendaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Griffith, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 96/00095

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 116 454 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 22 Août 1984 voir revendications ---	1-16
Y	CLINICAL CHEMISTRY, vol. 38, no. 11, Novembre 1992, WINSTON US, pages 2203-2214, XP002003383 G. S. BODOR ET AL.: "Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction." cité dans la demande voir page 2206 ---	1-16
A	WO,A,94 27156 (FORTRON BIOSCIENCE, INC.) 24 Novembre 1994 voir abrégé; revendications ---	1-16
Y	WO,A,93 13405 (TROPIX, INC.) 8 Juillet 1993 voir revendications 7-10 ---	1-4,6, 10,15,16
Y	WO,A,90 00168 (TROPIX, INC.) 11 Janvier 1990 voir le document en entier -----	1-4,6, 10,15,16

• RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à... Membres de familles de brevets

Document brevet cité au rapport de recherche

Date de publication

Membre(s) de la famille de brevet(s)

Date de publication

Der. de Internationale No

PLI/FR 96/00095

Document brevet cité au rapport de recherche

Date de publication

Membre(s) de la famille de brevet(s)

Date de publication

EP-A-116454

22-08-84

AU-B-

575552

04-08-88

AU-B-

2427184

16-08-84

CA-A-

1217121

27-01-87

JP-C-

1649482

30-03-92

JP-B-

3005539

25-01-91

JP-A-

59171839

28-09-84

US-A-

4598044

01-07-86

WO-A-9427156

24-11-94

AU-B-

6834894

12-12-94

CA-A-

2162121

24-11-94

EP-A-

0699306

06-03-96

WO-A-9313405

08-07-93

US-A-

5336596

09-08-94

AU-B-

3279293

28-07-93

CA-A-

2126447

08-07-93

EP-A-

0619018

12-10-94

FI-A-

943027

22-06-94

JP-T-

7502559

16-03-95

NO-A-

942386

22-06-94

WO-A-9000168

11-01-90

US-A-

4931223

05-06-90

DE-D-

68908685

30-09-93

DE-T-

68908685

05-01-94

EP-A,B

0377729

18-07-90

JP-T-

3505667

12-12-91